

# 尼美舒利对人胃癌 SGC7901 VCR 细胞耐药逆转作用

陈金晖<sup>1</sup>, 陈青青<sup>1</sup>, 陈 力<sup>2</sup>

(1. 温州医学院附属台州医院路桥院区普外科, 318050; 2. 浙江大学医学院附属二院普外科, 杭州 310000)

**[摘要]** 目的 研究尼美舒利对人胃癌敏感细胞株 SGC7901 及多药耐药细胞株 SGC7901VCR 的影响, 初步探讨其逆转人胃癌耐药的机制。方法 MTT 法测定细胞生长抑制率、流式细胞仪检测细胞内 Rh123 浓度和 P-170、GST- $\pi$  表达水平变化。结果 尼美舒利对 SGC7901 及 SGC7901VCR 细胞的生长抑制呈明显时间剂量依赖关系。但尼美舒利对 SGC7901VCR 细胞效应强度明显弱于 SGC7901 细胞。尼美舒利能提高 SGC7901VCR 细胞内 Rh123 荧光强度, 下调 P-170 和 GST- $\pi$  的水平 ( $P < 0.05$ )。结论 尼美舒利对人胃癌 SGC7901VCR 耐药有一定逆转作用, 作用机制可能与下调 P-170 和 GST- $\pi$  的水平有关。

**[关键词]** 尼美舒利; 胃癌; 耐药性; P-170; GST- $\pi$

**[中图分类号]** R983.1; R965

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-0781(2008)05-0515-03

## Multi-drug Resistance Reversion by Nimesulide on Gastric Cancer Cell Line SGC7901VCR

CHEN Jin-hui<sup>1</sup>, CHEN Qing-qing<sup>1</sup>, CHEN Li<sup>2</sup> (1. Department of General Surgery, Luqiao Branch, Taizhou Hospital Affiliated with the Wenzhou Medical College, Taizhou 318050, China; 2. Department of General Surgery, the Second Hospital Affiliated with the Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310000, China)

**ABSTRACT Objective** To evaluate the effect of nimesulide on gastric cancer cell line SGC7901VCR and SGC7901 and explore the mechanism of which reversing multi-drug resistance to gastric cancer cell line SGC7901VCR. **Methods** Cell suppression rates were detected by MTT assay. Rh123 concentration in cells and expressions of P-170, GST- $\pi$  were analyzed by flow cytometry. **Results** Nimesulide inhibited the cell growth of SGC7901VCR and SGC7901 in a dose and time dependent manner, especially for SGC7901 cells. Rh123 fluorescence intensity in the SGC7901VCR cell was obviously increased and P-170, GST- $\pi$  expressions were decreased by nimesulide ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Nimesulide can partly reverse multi-drug resistance to gastric cancer cell line SGC7901VCR, the mechanism of which may be associated with decreasing expressions of P-170 and GST- $\pi$ .

**KEY WORDS** Nimesulide; Gastric cancer; Drug Resistance; P-170; GST- $\pi$

肿瘤化疗失败的重要原因是肿瘤产生多药耐药, 寻找高效的耐药逆转药已成为肿瘤治疗研究的方向之一。近年来研究表明, 环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, Cox-2) 在肿瘤的发生中可能起到重要的作用, 选择性 Cox-2 抑制药具有抗癌作用, 并有一定的耐药逆转作用。尼美舒利是一种人工合成的选择性 Cox-2 抑制药, 近来研究发现对多种肿瘤细胞有明显的抑制作用, 但尼美舒利对胃癌的耐药逆转作用笔者未见报道。本研究以人胃癌敏感细胞株 SGC7901 及多药耐药细胞株 SGC7901VCR 为研究对象, 通过观察细胞的生长抑制率、细胞内 Rh123 浓度和多药耐药相关蛋白 P-170、GST- $\pi$  的表达, 探讨尼美舒利逆转人胃癌耐药的机制, 现报道如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料 人胃癌敏感细胞株 SGC7901 及多药耐药

细胞株 SGC7901VCR 购自上海中科院细胞库; 尼美舒利: Sigma 公司; 罗丹明 (Rh123): Sigma 公司; 新生胎牛血清: 杭州四季青公司; 酶标仪: 美国 BW-Tek 公司 EL301 型; 流式细胞仪: FACS Calibur; 抗 P-170、抗 GST- $\pi$  单抗和羊抗鼠 FITC-IgG 单抗: 购自晶美公司。

#### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** SGC7901 和 SGC7901VCR 细胞株用含 10% 胎牛血清和双抗 (青霉素、链霉素各 100 U · mL<sup>-1</sup>) RPMI 1640 液, 在 37 °C、5% 二氧化碳培养箱中生长传代, 实验时取对数生长期细胞。

**1.2.2 MTT 法测定生长抑制率** 取对数生长期 SGC7901 和 SGC7901VCR 细胞, 按每孔  $5 \times 10^4$  个细胞接种于 96 孔培养板, 加入不同浓度尼美舒利 (25, 100, 400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的培养液 (各设 3 个复孔)。继续培养 24, 48, 72 h 后, 常规 MTT 法测定生长抑制率。

**1.2.3 流式细胞仪测定细胞内 Rh123 浓度** 分别取 SGC7901 和 SGC7901VCR 细胞悬液 (浓度  $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 加入 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  尼美舒利孵育 72 h 后

**[收稿日期]** 2007-05-18

**[作者简介]** 陈金晖 (1975 -), 男, 浙江台州人, 学士, 主治医师, 主要研究方向: 胃肠道肿瘤。电话: (0) 13968659900, E-mail: dxlw120@126.com。

加入 4  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Rh123 孵育 90 min,另取同样传代的 SGC7901 和 SGC7901VCR 细胞加入 4  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Rh123 孵育 90 min 作阴性对照,冷 PBS 洗两次后用流式细胞仪测定细胞内 Rh123 的浓度。

**1.2.4 细胞内 P-170、GST- $\pi$  表达水平的变化** 收集 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  尼美舒利处理 72 h 的 SGC7901 和 SGC7901VCR 细胞及阴性对照细胞,PBS 洗 2 次,弃去上清液,分别加入 1 : 100 稀释的抗 P-170、抗 GST- $\pi$  单抗各 100  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  水箱温育 30 min,PBS 洗涤,再分别加入 1 : 200 稀释的羊抗鼠 FITC-IgG 单抗 100  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  温育 30 min,离心洗涤多余抗体,上机前加 PBS 1.0 mL,经 500 目滤网过滤后上机,计算阳性百分率。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS11.5 软件进行统计分析。采用方差分析或  $t$  检验。以  $P < 0.05$  表示差异有显著性。

## 2 结果

**2.1 不同浓度尼美舒利对 SGC7901 和 SGC7901VCR 细胞生长的抑制作用** 不同浓度尼美舒利(25,100,400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )对 SGC7901 和 SGC7901VCR 的生长抑制呈明显时间剂量依赖关系。尼美舒利作用 48 h 后即能明显抑制 SGC7901 细胞生长,其中 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  为尼美舒利作用 48 h 半数抑制剂量。尼美舒利对 SGC7901VCR 细胞生长抑制的效应强度明显弱于对 SGC7901 细胞,且效应时间明显滞后,72 h 才出现稍明显的生长抑制。

**2.2 尼美舒利对 SGC7901 和 SGC7901VCR 细胞内 Rh123 浓度的影响** 由表 1 可知,加入 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  尼美舒利后 SGC7901VCR 细胞内 Rh123 荧光强度明显增加 ( $P < 0.05$ ),说明尼美舒利能明显提高 SGC7901VCR 细胞对 Rh123 的蓄积能力。加入 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  尼美舒利前后 SGC7901 细胞内 Rh123 荧光强度比较,差异无显著性。

**2.3 尼美舒利对 SGC7901 和 SGC7901VCR 细胞内 P-170 和 GST- $\pi$  表达的影响** 由表 1 可知,100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  尼美舒利作用 SGC7901VCR 细胞后 P-170 和 GST- $\pi$  的表达均明显下调(均  $P < 0.05$ );而 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  尼美舒利作用 SGC7901 细胞前后 P-170 和 GST- $\pi$  的表达差异无显著性。

## 3 讨论

近年来我国胃癌的发病率明显增高,严重危及人民的健康。目前胃癌的治疗方法主要是手术切除和化疗,其中化疗在胃癌的治疗中起着举足轻重的作用。临床治疗中常因胃癌细胞产生多药耐药导致化疗失败。寻求逆转耐药的有效药物是当前重要研究课题,

表 1 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  尼美舒利对 SGC7901 和 SGC7901VCR 细胞内 Rh123 荧光强度与 GST- $\pi$  表达的影响  
%, $n = 3, \bar{x} \pm s$

组别与时间	Rh123 荧光强度	P-170	GST- $\pi$
SGC7901VCP			
处理前	26.56	93.26 $\pm$ 3.60	76.60 $\pm$ 2.38
处理后	82.36 <sup>*1</sup>	50.20 $\pm$ 2.51 <sup>*1</sup>	24.67 $\pm$ 1.32 <sup>*1</sup>
SGC7901			
处理前	70.39	28.06 $\pm$ 1.42	18.63 $\pm$ 0.59
处理后	72.75	26.74 $\pm$ 2.35	16.84 $\pm$ 0.87

与本组处理前比较, <sup>\*1</sup> $P < 0.05$

也是提高胃癌化疗疗效的重要手段。

尼美舒利是一种人工合成的选择性 Cox-2 抑制药,近来研究发现尼美舒利对多种肿瘤细胞具有抑制作用,其主要的抗肿瘤机制为抑制 Cox-2 的表达<sup>[1]</sup>。刘红英等<sup>[2]</sup>发现尼美舒利能增强丝裂霉素抑制人胃癌细胞株 SGC7901 及其耐药亚系 SGC7901 VCR 的细胞增殖和诱导其凋亡的作用,尼美舒利对体外培养的人胃癌细胞株的多药耐药有一定逆转作用。笔者在本研究中发现尼美舒利能抑制人胃癌 SGC7901 和 SGC7901VCR 细胞的生长,且抑制率具有浓度和时间依赖性,但相应剂量尼美舒利对 SGC7901VCR 细胞的抑制效应明显弱于 SGC7901,且效应时间明显滞后,与上述报道相类似<sup>[2]</sup>。

P-170 是 MDR1 基因的蛋白产物,在 ATP 的参与下,P-170 发生能量依赖性变构,将细胞内药物“泵出”细胞外,造成细胞内药物浓度下降,细胞毒作用降低或完全丧失,细胞产生耐药。GST- $\pi$  最初是从人胎盘中分离出的酸性谷胱甘肽-s-转移酶,以后发现在人体正常组织中广泛表达,在恶性肿瘤中往往异常高表达。其耐药机制是能把抗癌药物产生的过氧化物还原为无毒物质,还可抑制烷化药等亲电性化疗药物引起的癌细胞 DNA 交联,从而降低化疗药物对细胞的杀伤作用。近年的研究表明,肿瘤细胞膜上的药物外流泵向外排出药物,致细胞内药物浓度降低是引起多药耐药的主要原因<sup>[3]</sup>,GST- $\pi$  表达升高导致肿瘤细胞对化疗药解毒作用增强也参与了多药耐药形成<sup>[4]</sup>。本研究发现尼美舒利能明显提高 SGC7901VCR 细胞对 Rh123 的蓄积能力,说明尼美舒利能增强化疗药对 SGC7901VCR 的毒性作用,而对 SGC7901 细胞却无上述作用。其作用机制可能是通过下调 P-170 和 GST- $\pi$  的水平,提高细胞内药物浓度,部分逆转了 SGC7901VCR 耐药性。

综上所述,尼美舒利不但是一种抗肿瘤药物,还是一种潜在的低毒耐药逆转药,在胃癌的临床治疗方面

具有良好的应用前景。

[参考文献]

- [1] 刘红英,张 剌,曾文良. 尼美舒利逆转人胃癌细胞耐药的实验研究[J]. 肿瘤防治杂志, 2005, 12(3): 197 - 201.
- [2] RATNASINGHE D, DASCHNER P J, ANVER M R, *et al.* Cyclooxygenase-2, Pglycoprotein-170 and drug resistance: is chemoprevention against multidrug resistance possible? [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(30): 2147 - 2177.
- [3] SAWICKA M, KALINOWSKA M, SKIERSKI J, *et al.* A review of selected antitumour therapeutic agents and reason for multidrug resistance occurrence [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2004, 55(9): 1057 - 1081.
- [4] MATTEM J, KOOMAGI R, VOLM M. Expression of drug resistance gene products during progression of lung carcinomas[J]. *Oncology Reports*, 2002, 9: 1181 - 1184.

## 三七总苷对体外培养细胞胶原合成模型的影响

薛 青<sup>1</sup>, 薛绍礼<sup>2</sup>, 汪亚松<sup>2</sup>, 张 菁<sup>3</sup>, 王 怡<sup>2</sup>, 夏觅真<sup>2</sup>

(1. 首都医科大学宣武医院 2003 级, 北京 100053; 2. 安徽医科大学医学生物工程教研室, 合肥 230032; 3. 安徽医科大学生物技术专业 2002 级, 合肥 230032)

**[摘要]** 目的 建立体外培养细胞胶原合成模型并研究三七总苷对胶原合成的影响。方法 用不同浓度和比例的新生牛血清和大鼠血清混合, 筛选刺激 HSC-T6 细胞胶原合成的最佳条件, 继而用<sup>3</sup>H-Proline 掺入法研究三七总苷对其胶原合成的影响。结果 10% 新生牛血清加 3% 大鼠血清为刺激 HSC-T6 细胞胶原合成最佳培养条件。培养 48 和 72 h 后, 0.01, 0.05, 0.25, 1.00 和 1.25 mg · mL<sup>-1</sup> 浓度的三七总苷对 HSC-T6 细胞胶原合成有明显的抑制作用 ( $P < 0.05$ ); 并呈剂量效应关系和时间效应关系, 方差分析,  $F$  分别为 4.517 和 5.832 (均  $P < 0.05$ )。结论 成功建立了体外培养细胞胶原合成模型, 三七总苷对细胞胶原合成有明显抑制作用。

**[关键词]** 三七总苷; 肝星状细胞; 胶原合成

**[中图分类号]** R286; R965

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-0781(2008)05-0517-03

### Effect of PNS on Collagen Synthesis in HSC-T6 Cells

XUE Qing<sup>1</sup>, XUE Shao-li<sup>2</sup>, WANG Ya-song<sup>2</sup>, ZHANG Jing<sup>3</sup>, WANG Yi<sup>2</sup>, XIA Mi-zhen<sup>2</sup> (1. Grade 2003, Xuanwu Hospital, Capital Medical Science University, Beijing 100053, China; 2. Department of Medical Biotechnology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 3. Grade 2002, Specialty of Biological Technology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

**ABSTRACT Objective** To establish a model of collagen synthesis *in vitro* and to probe the effect of PNS on that. **Methods** HSC-T6 cells were incubated with the mixed sera containing different concentrations of NBS and rat sera, so as to establish a mixed sera-driven collagen synthesis model. PNS was studied on the collagen synthesis model by <sup>3</sup>H-Proline incorporation method. **Results** 10% NBS with 3% rat serum was the best condition for stimulating the collagen synthesis in HSC-T6 cells. After 48 and 72 hours' incubation, 0.01, 0.05, 0.25, 1.00 and 1.25 mg · mL<sup>-1</sup> PNS significantly suppressed the collagen synthesis in HSC-T6 cells ( $P < 0.05$ ) in a concentration and time dependent manner ( $F = 4.517$  and  $5.832$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** A mixed sera-driven collagen synthesis model has been successfully established, and PNS markedly inhibits collagen synthesis in HSC-T6 cells.

**KEY WORDS** PNS; HSC-T6 cell; Collagen synthesis

肝纤维化是一切慢性肝病共同病理学基础, 是形成肝硬化的必经病理阶段。目前肝纤维化发生机制

的研究已深入到细胞生物学和分子生物学水平。大量资料表明, 肝星状细胞(HSC)的活化是肝纤维化发生的细胞学基础, 是各种病因肝纤维化发生的共同中心环节, 活化的 HSC 也是合成细胞外间质(ECM)的主要细胞<sup>[1,2]</sup>。

近年来, 中药抗肝纤维化的研究取得了较大进展<sup>[3]</sup>, 文献表明, 三七总苷(PNS)具有明显减轻肝细胞坏死、促进肝细胞修复再生、抑制肝组织中成纤维细

**[收稿日期]** 2007-08-21

**[作者简介]** 薛 青(1985 -), 女, 江苏涟水人, 在读硕士, 主要从事临床诊治和研究工作。电话: (0)13811185203, E-mail: pippak@sina.com。

**[通讯作者]** 薛绍礼(1962 -), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事医学生物工程和生物医药研究。电话: 0551 - 5161238, E-mail: xuesl@sina.com。